

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C07K 7/06, 7/08, C12N 15/10, A61K 38/04, A61P 7/02</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/37487</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juni 2000 (29.06.00)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/09842 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 11. Dezember 1999 (11.12.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 58 587.7 19. Dezember 1998 (19.12.98) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> DIEFENBACH, Beate [DE/DE]; Friedrich-Ebert-Platz 19, D-64289 Darmstadt (DE). JONCZYK, Alfred [DE/DE]; Schepp-Allee 57, D-64295 Darmstadt (DE). KRAFT, Sabine [DE/DE]; Giselherstrasse 8, D-65668 Rimbach (DE). MEHTA, Ray [IN/GB]; MRC Collaborative Centre, 1-3 Bustanhole Lane, Mill London NW7 1AD (GB). <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> $\alpha_v\beta_6$ INTEGRIN INHIBITORS <b>(54) Bezeichnung:</b> INHIBITOREN DES INTEGRINS $\alpha_v\beta_6$ <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to novel peptides which are biologically active as ligands of <math>\alpha_v\beta_6</math> integrin. Said peptides have a common structural motif, i.e. Asp Leu Xaa Leu – or in a preferred form Arg Xaa Asp Leu Xaa Xaa Leu Arg–, wherein Xaa represents any amino acid radical. The peptides according to the invention can be used as efficient <math>\alpha_v\beta_6</math> integrin receptor inhibitors and consequently in the treatment of different diseases and pathologies.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung beschreibt neuartige Peptide, welche als Liganden des Integrins <math>\alpha_v\beta_6</math> biologisch wirksam sind. Diese Peptide weisen alle ein gemeinsames Strukturmotiv, nämlich – Asp Leu Xaa Leu –, bzw. in einer bevorzugten Form – Arg Xaa Asp Leu Xaa Xaa Leu Arg – auf, wobei Xaa für einen beliebigen Aminosäurerest steht. Die erfindungsgemäßen Peptide können als wirksame Inhibitoren des <math>\alpha_v\beta_6</math>-Integrin-Rezeptors und somit zur Behandlung verschiedener Krankheiten und pathologischer Befunde eingesetzt werden.</p>			

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

### Inhibitoren des Integrins $\alpha_v\beta_6$

Die Erfindung beschreibt neuartige Peptide, welche als Liganden des Integrins  $\alpha_v\beta_6$  biologisch wirksam sind. Diese Peptide weisen alle ein gemeinsames  
 5 Strukturmotiv, nämlich – **Asp Leu Xaa Xaa Leu** –, bzw. in einer bevorzugten Form – **Arg Xaa Asp Leu Xaa Xaa Leu Arg** – auf, wobei Xaa für einen beliebigen Aminosäurerest steht. Die erfindungsgemäßen Peptide können als wirksame Inhibitoren des  $\alpha_v\beta_6$  Integrin-Rezeptors und somit zur Behandlung verschiedener Krankheiten und pathologischer Befunde eingesetzt werden.

10

Integrine gehören zu der Familie von heterodimeren Klasse I – Transmembran-Rezeptoren, die in zahlreichen Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell- Adhäsionsvorgängen eine wichtige Rolle spielen (Tuckwell et al., 1996, Symp. Soc. Ex. Biol. 47). Sie können grob in drei Klassen eingeteilt werden: die  $\beta_1$ -Integrine, die Rezeptoren  
 15 für die extrazelluläre Matrix darstellen, die  $\beta_2$ -Integrine, welche auf Leukozyten aktivierbar sind und während inflammatorischen Prozessen "getriggert" werden, sowie die  $\alpha_v$ -Integrine, die die Zellantwort bei Wundheilungs- und anderen pathologischen Prozessen beeinflussen (Marshall and Hart, 1996, Semin. Cancer Biol. 7, 191).

20

Die Integrine  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{11b}\beta_3$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_6$  binden alle an die Arg-Gly-Asp (RGD) Peptidsequenz, z.B. im natürlichen Liganden Fibronectin. Lösliche RGD-haltige Peptide vermögen die Interaktion jedes dieser Integrine mit Fibronectin zu inhibieren.  $\alpha_v\beta_6$  ist ein relativ seltenes Integrin (Busk et al., 1992 J. Biol. Chem.  
 25 267(9), 5790), das bei Reperaturvorgängen in Epithelgewebe vermehrt gebildet wird und die natürlichen Matrixmoleküle Fibronectin und Tenascin bevorzugt bindet (Wang et al., 1996, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15(5), 664). Die physiologischen und pathologischen Funktionen von  $\alpha_v\beta_6$  sind noch nicht genau bekannt, es wird jedoch vermutet, daß dieses Integrin bei physiologischen  
 30 Vorgängen und Erkrankungen (z. B. Entzündungen, Wundheilung, Tumore), bei denen epitheliale Zellen beteiligt sind, eine wichtige Rolle spielt. So wird  $\alpha_v\beta_6$  auf Keratinozyten in Wunden exprimiert (Haapasalmi et al., 1996, J. Invest. Dermatol. 106(1), 42), woraus anzunehmen ist, daß neben Wundheilungsprozessen und

Entzündungen auch andere pathologische Ereignisse der Haut, wie z. B. Psoriasis, durch Agonisten oder Antagonisten des besagten Integrins beeinflussbar sind. Ferner spielt  $\alpha_v\beta_6$  im Atemwegsepithel eine Rolle (Weinacker et al., 1995, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12(5), 547), so daß entsprechende Agonisten / Antagonisten dieses Integrins bei Atemwegserkrankungen, wie Bronchitis, Asthma, Lungenfibrosen und Atemwegstumoren erfolgreich eingesetzt werden könnten. Letztlich ist bekannt, daß  $\alpha_v\beta_6$  auch im Darmepithel eine Rolle spielt, so daß entsprechende Integrin-Agonisten/-Antagonisten bei der Behandlung von Entzündungen, Tumoren und Wunden des Magen/Darmtraktes Verwendung finden könnten.

Bislang ist noch kein niedermolekularer Inhibitor gefunden worden, der selektiv an das  $\alpha_v\beta_6$  -Integrin bindet. Es bestand somit die Aufgabe, neben den bisher bekannten natürlichen hochmolekularen Liganden und Antikörpern, die therapeutisch und diagnostisch schwer handhabbar sind, potente, spezifische bzw. selektive niedermolekulare Liganden für  $\alpha_v\beta_6$ , vorzugsweise Peptide, zu finden, die für die genannten therapeutischen Gebiete aber auch als Diagnostikum oder Reagenz verwendet werden können.

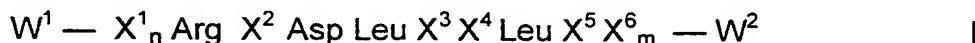
Es wurde gefunden, daß die peptidischen Verbindungen der unten dargelegten Formeln und ihre Salze als lösliche Moleküle Wirkung auf Zellen ausüben, die den genannten Rezeptor tragen, oder wenn sie an Oberflächen gebunden sind, künstliche Liganden für die  $\alpha_v\beta_6$  - vermittelte Zellanhaftung darstellen. Vor allem wirken sie als  $\alpha_v\beta_6$  Integrin-Inhibitoren, wobei sie insbesondere die Wechselwirkungen des Rezeptors mit anderen Liganden hemmen, wie z. B. die Bindung von Fibronectin. Diese Wirkung kann z.B. nach der Methode nachgewiesen werden, die von J.W. Smith et al. in J. Biol. Chem. 265, 12267-12271 (1990) beschrieben wird.

Die Abhängigkeit der Entstehung von Angiogenese von der Wechselwirkung zwischen vaskulären Integrinen und extrazellulären Matrixproteinen ist von P.C. Brooks, R.A. Clark und D.A. Cheresh in Science 264, 569-71 (1994) beschrieben.

Weiter wurde gefunden, daß die neuen Substanzen bei guter Verträglichkeit sehr wertvolle pharmakologische Eigenschaften besitzen und als Arzneimittel eingesetzt werden können. Dies wird weiter unten genauer beschrieben.

- 5 Die erfindungsgemäßen peptidischen Verbindungen können ferner als Diagnostika zur Detektion und Lokalisierung von pathologischen Zuständen im epithelialen System *in vivo* verwendet werden, wenn sie mit entsprechenden Markern (z.B. dem Biotinylrest ) nach dem Stand der Technik ausgestattet sind. Die Erfindung umfaßt auch Konjugate mit anderen Wirkstoffen, wie zytotoxischen
- 10 Wirkstoffen sowie Konjugate mit Radiomarkern für Röntgentherapie oder PET Diagnose aber auch Fusionsproteine mit Markerproteinen wie GFP oder Antikörpern, oder therapeutischen Proteinen wie IL-2.
- Gegenstand der Erfindung sind somit peptidische Verbindungen der Formel I

15



worin bedeuten:

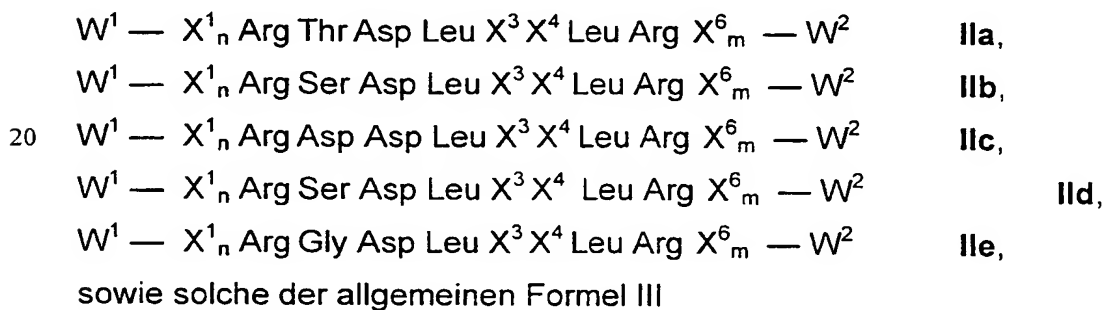
- $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6$  jeweils unabhängig voneinander einen
- 20 Aminosäurerest, wobei die Aminosäuren unabhängig voneinander ausgewählt sind aus einer Gruppe bestehend aus Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Gly, Phe, His, Ile, Leu, Lys, Met, Nle, homo-Phe, Phg, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr oder Val, und die genannten Aminosäuren auch derivatisiert sein können,
- $W^2$  ausgewählt aus der Gruppe OH, OR, NHR, NR<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>,
- 25  $W^1$  H oder Acylrest
- $R$  Alkyl mit 1-6 C-Atomen und

- $n, m$  jeweils unabhängig voneinander eine Zahl von 0 – 15. In den
- 30 Fällen, in denen  $m$  bzw.  $n$  einen Wert größer als 1 annimmt, können die Reste  $X^1$  bzw.  $X^6$  jeweils unabhängig voneinander gleich oder verschieden sein.

Erfindungsgemäß sind auch solche Aminosäuren bzw. Aminosäurereste mit  
umfaßt, welche ausgehend von den natürlichen Aminosäuren, derivatisiert sind,  
Homologe oder Isomere derselben sind. Die Aminosäurereste sind üblicherweise  
über ihre alpha-Amino- und alpha-Carboxygruppen miteinander verknüpft  
5 (Peptidbindung).

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin in bevorzugter Weise solche  
peptidische Verbindungen, worin  $X^2$  einen Aminosäurerest darstellt, der  
ausgewählt wurde aus der Gruppe Thr, Ser, Asp und Glycin, ferner solche  
10 peptidische Verbindungen, worin  $X^3$  ein Aminosäurerest ist, der ausgewählt  
wurde aus der Gruppe Asp, Glu, Arg, Lys, His und Tyr, und schließlich solche  
peptidische Verbindungen, worin  $X^4$  ein Aminosäurerest ist, der ausgewählt  
wurde aus der Gruppe Ser, Tyr, Thr, Gly und Val.

15 Unter die bevorzugten Verbindungen (Bedeutungen bzw. Abkürzungen siehe  
oben und unten) fallen also solche der allgemeinen Formel II



sowie solche der allgemeinen Formel IV

- 5 -

- $W^1 - X^1_n \text{ Arg } X^2 \text{ Asp Leu } X^3 \text{ Ser Leu Arg } X^6_m - W^2$  **IVa,**  
 $W^1 - X^1_n \text{ Arg } X^2 \text{ Asp Leu } X^3 \text{ Tyr Leu Arg } X^6_m - W^2$  **IVb,**  
 $W^1 - X^1_n \text{ Arg } X^2 \text{ Asp Leu } X^3 \text{ Thr Leu Arg } X^6_m - W^2$  **IVc,**  
 $W^1 - X^1_n \text{ Arg } X^2 \text{ Asp Leu } X^3 \text{ Gly Leu Arg } X^6_m - W^2$  **IVd,**  
 5  $W^1 - X^1_n \text{ Arg } X^2 \text{ Asp Leu } X^3 \text{ Val Leu Arg } X^6_m - W^2$  **IVe.**

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße peptidische Verbindungen sind die der Formel V

- 10  $W^1 - X^1_n \text{ Arg Thr Asp Leu Asp Ser Leu Arg } X^6_m - W^2$  **V,**

und hierbei insbesondere die der Formel VI

- $W^1 - X^1_n \text{ Arg Thr Asp Leu Asp Ser Leu Arg Thr } X^{6_{m-1}} - W^2$  **VI.**

15

Schließlich sind die folgenden Einzelverbindungen besonders bevorzugt, wobei auch solche eingeschlossen sind, die an den N- und C-Termini modifiziert sind:

- (a) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-Tyr-Thr-Leu-OH  
 20 (b) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-OH  
 (c) Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-OH  
 (d) Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-NH<sub>2</sub>  
 (e) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-OH  
 (f) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-NH<sub>2</sub>  
 25 (g) H-Arg-Thr-Asp-Leu-Tyr-Tyr-Leu-Arg-Thr-Tyr-OH  
 (h) Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

Die vor- und nachstehend aufgeführten Abkürzungen stehen für die Reste folgender Aminosäuren:

- 30 Ala A Alanin  
 Asn N Asparagin  
 Asp D Asparaginsäure  
 Arg R Arginin

	Cys	C	Cystein
	Gln	Q	Glutamin
	Glu	E	Glutaminsäure
	Gly	G	Glycin
5	His	H	Histidin
	Ile	I	Isoleucin
	Leu	L	Leucin
	Lys	K	Lysin
	Met	M	Methionin
10	Nle		Norleucin
	Orn		Ornithin
	Phe	F	Phenylalanin
	Phg		Phenylglycin
	Pro	P	Prolin
15	Ser	S	Serin
	Thr	T	Threonin
	Trp	W	Tryptophan
	Tyr	Y	Tyrosin
	Val	V	Valin

20

Sofern die vorstehend genannten Aminosäuren in mehreren enantiomeren Formen auftreten können, so sind vor- und nachstehend, z. B. als Bestandteil der Verbindungen der Formeln I-VI, alle diese Formen und auch ihre Gemische eingeschlossen. Ferner können die Aminosäuren, z. B. als Bestandteil von

25 Verbindungen der Formeln I-VI, mit entsprechenden an sich bekannten Schutzgruppen versehen sein.

Die Verbindungen der Formel I – VI können ein oder mehrere chirale Zentren besitzen und daher in verschiedenen stereoisomeren Formen vorkommen. Die angegebenen Formeln umschließen alle diese Formen, insbesondere die D- und

30 L-Formen und zwar sowohl in enantiomeren als auch in racemischen Gemischen. Schließlich umfassen die oben und unten genannten Formeln I und II auch erfindungsgemäß die entsprechenden Salze, insbesondere die entsprechenden physiologisch unbedenklichen Salze.



In die erfindungsgemäßen Verbindungen sind auch sogenannte Prodrug-Derivate eingeschlossen, d. h. mit z. B. Alkyl- oder Acylgruppen, Zuckern oder Oligopeptiden abgewandelte Verbindungen der Formel I, die im Organismus rasch zu den wirksamen erfindungsgemäßen Verbindungen gespalten werden.

- 5 Ferner sind in die erfindungsgemäßen Verbindungen auch Derivate mit eingeschlossen, welche aus den eigentlichen erfindungs-gemäßen Peptiden und bekannten Marker-Verbindungen bestehen, die es ermöglichen, die Peptide leicht nachzuweisen. Beispiele für solche Derivate sind biotinylierte oder fluoreszenzmarkierte Peptide.
- 10 Im allgemeinen sind die erfindungsgemäßen Peptide linear, sie können aber auch zyklisiert werden. Die Erfindung umfaßt nicht nur die genannten Peptide der Formeln I bis VI sondern auch Mischungen und Zubereitungen, welche neben diesen erfindungsgemäßen Verbindungen auch andere pharmakologische Wirkstoffe oder Adjuvantien enthalten, die die primäre pharmakologische Wirkung
- 15 der erfindungsgemäßen Peptide in gewünschter Weise beeinflussen können.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen und auch die Ausgangsstoffe zu ihrer Herstellung werden im übrigen nach an sich bekannten und häufig eingesetzten Methoden hergestellt, wie sie in der Literatur (z.B. in den Standardwerken wie

20 Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart; beschrieben sind, und zwar unter Reaktionsbedingungen, die für die genannten Umsetzungen bekannt und geeignet sind. Dabei kann man auch von an sich bekannten Varianten Gebrauch machen.

- 25 Vorzugsweise können die erfindungsgemäßen Peptide mittels Festphasensynthese und nachfolgender Abspaltung und Reinigung hergestellt werden, wie dies z.B. von *Jonczyk und Meienhofer* (Peptides, Proc. 8th Am. Pept. Symp., Eds. V. Hruby und D.H.Rich, Pierce Comp. III, p. 73-77, 1983, oder Angew. Chem. 104, 1992, 375) oder gemäß Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 94,
- 30 1972, 3102) beschrieben wurde. Im übrigen können sie nach üblichen Methoden der Aminosäure- und Peptidsynthese hergestellt werden, wie dies z. B. aus Novabiochem – 1999 Catalog & Peptide Synthesis Handbook der Calbiochem-Novabiochem GmbH, D-65796 Bad Soden, aus zahlreichen Standardwerken und

publizierten Patentanmeldungen bekannt sind. Biotinylierte oder fluoreszenzmarkierte Peptide / Proteine können ebenfalls nach Standardmethoden hergestellt werden (z.B. E.A. Bayer and M. Wilchek in Methods of Biochemical Analysis Vol 26 The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology; und Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6<sup>th</sup> Edition, 1996, by R.P. Haugland, Molecular Probes, Inc.; oder auch WO 97/14716).

Selbstverständlich können die erfindungsgemäßen Peptide der Formeln I – VI auch durch Solvolyse, insbesondere Hydrolyse, oder durch Hydrogenolyse ihrer funktionellen Derivate freigesetzt werden. Bevorzugte Ausgangsstoffe für die Solvolyse bzw. Hydrogenolyse sind solche, die anstelle einer oder mehrerer freier Amino- und/oder Hydroxygruppen entsprechende geschützte Amino- und/oder Hydroxygruppen enthalten, vorzugsweise solche, die anstelle eines H-Atoms, das mit einem N-Atom verbunden ist, eine Aminoschutzgruppe oder die anstelle des H-Atoms einer Hydroxygruppe eine Hydroxyschutzgruppe tragen. Entsprechendes gilt für Carbonsäuren, die durch Substitution ihrer –CO-OH Hydroxyfunktion mittels einer Schutzgruppe, z.B. als Ester geschützt werden können.

Der Ausdruck "Aminoschutzgruppe" ist allgemein bekannt und bezieht sich auf Gruppen, die geeignet sind, eine Aminogruppe vor chemischen Umsetzungen zu schützen (zu blockieren), die aber leicht entfernbar sind, nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des Moleküls durchgeführt worden ist. Der Ausdruck "Hydroxyschutzgruppe" ist ebenfalls allgemein bekannt und bezieht sich auf Gruppen, die geeignet sind, eine Hydroxygruppe vor chemischen Umsetzungen zu schützen, die aber leicht entfernbar sind, nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des Moleküls durchgeführt worden ist. Das In-Freiheit-Setzen der Verbindungen aus ihren funktionellen Derivaten gelingt - je nach der benutzten Schutzgruppe - z. B. mit starken Säuren, zweckmäßig mit TFA oder Perchlorsäure, aber auch mit anderen starken anorganischen Säuren wie Salzsäure oder Schwefelsäure, starken organischen Carbonsäuren wie Trichloressigsäure oder Sulfonsäuren wie

Benzol- oder p-Toluolsulfonsäure. Hydrogenolytisch entfernbare Schutzgruppen (z. B. CBZ oder Benzyl) können z. B. durch Behandeln mit Wasserstoff in Gegenwart eines Katalysators (z. B. eines Edelmetallkatalysators wie Palladium, zweckmäßig auf einem Träger wie Kohle) abgespalten werden. Die

5 Verfahrensdurchführungen sind allgemein bekannt und sollen hier nicht weiter beschrieben werden.

Wie bereits erwähnt, umfassen die erfindungsgemäßen Peptide ihre physiologisch unbedenklichen Salze, welche ebenfalls nach Standardmethoden

10 hergestellt werden können. So kann eine Base der Formel I mit einer Säure in das zugehörige Säureadditionssalz übergeführt werden, beispielsweise durch Umsetzung äquivalenter Mengen der Base und der Säure in einem inerten Lösungsmittel wie Ethanol und anschließendes Eindampfen. Für diese Umsetzung kommen insbesondere Säuren in Frage, die physiologisch

15 unbedenkliche Salze liefern. So können anorganische Säuren verwendet werden, z.B. Schwefelsäure, Salpetersäure, Halogenwasserstoffsäuren wie Chlorwasserstoffsäure oder Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäuren wie Orthophosphorsäure, Sulfaminsäure, ferner organische Säuren, insbesondere aliphatische, alicyclische, araliphatische, aromatische oder heterocyclische ein-

20 oder mehrbasige Carbon-, Sulfon- oder Schwefelsäuren, z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Pivalinsäure, Diethylelessigsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Pimelinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Citronensäure, Gluconsäure, Ascorbinsäure, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Methan- oder Ethansulfonsäure, Ethandisulfonsäure, 2-

25 Hydroxyethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Naphthalinmono- und Disulfonsäuren, Laurylschwefelsäure. Salze mit physiologisch nicht unbedenklichen Säuren, z.B. Pikrate, können zur Isolierung und /oder Aufreinigung der erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden. Andererseits kann eine Säure der Formel I durch Umsetzung mit einer Base in eines ihrer

30 physiologisch unbedenklichen Metall- oder Ammoniumsalze übergeführt werden. Als Salze kommen dabei insbesondere die Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Calcium- und Ammoniumsalze in Betracht, ferner substituierte Ammoniumsalze, z. B. die Dimethyl-, Diethyl- oder Diisopropyl-ammoniumsalze, Monoethanol-,

Diethanol- oder Diisopropylammoniumsalze, Cyclohexyl-, Dicyclohexylammoniumsalze, Dibenzylethylendiammoniumsalze, weiterhin z. B. Salze mit Arginin oder Lysin.

- 5 Die erfindungsgemäßen peptidischen Verbindungen können, wie bereits erwähnt, als Arzneimittelwirkstoffe in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, insbesondere zur Prophylaxe und/oder Therapie von Erkrankungen bei denen epitheliale Zellen beteiligt sind. Besonders hervorzuheben sind hierbei Erkrankungen oder Entzündungen oder
- 10 Wundheilungsprozesse der Haut, der Atemwegorgane und des Magen- und Darmbereichs, so zum Beispiel Apoplexie, Angina pectoris, Tumorerkrankungen, osteolytischen Krankheiten wie Osteoporose, pathologisch angiogenen Krankheiten wie z. B. Entzündungen, Lungenfibrose, ophthalmologischen Krankheiten, diabetischer Retinopathie, makularer Degeneration, Myopia, okularer
- 15 Histoplasmose, rheumatischer Arthritis, Osteoarthritis, rubeotischem Glaukom, ulcerativer Colitis, Morbus Crohn, Atherosklerose, Psoriasis, Restenose nach Angioplastie, bei akutem Nierenversagen oder Nierenentzündung.

- Gegenstand der Erfindung sind demgemäß peptidische Verbindungen der oben
- 20 und unten sowie in den Ansprüchen definierten Formeln einschließlich ihrer physiologisch unbedenklichen Salze als Arzneimittel, Diagnostika oder Reagenzien.

- Gegenstand der Erfindung sind insbesondere entsprechende Arzneimittel als
- 25 Inhibitoren zur Bekämpfung von Erkrankungen, die mittelbar oder unmittelbar auf einer Expression des  $\alpha_v\beta_6$ -Integrinrezeptors beruhen, insbesondere also bei pathologisch angiogenen Erkrankungen, Thrombosen, Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Tumoren, Osteoporose, Entzündungen, Infektionen sowie zur Beeinflussung von Wundheilungsprozessen.

- 30 Gegenstand sind auch entsprechende pharmazeutische Zubereitungen, welche mindestens ein Arzneimittel der Formeln I bis VI sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe enthalten.

Ferner ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung der peptidischen Verbindungen und/oder ihre physiologisch unbedenklichen Salze gemäß der Ansprüche und der Beschreibung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Erkrankungen, die mittelbar oder unmittelbar auf einer Expression des  $\alpha_v\beta_6$  –Integrinrezeptors beruhen, insbesondere also bei pathologisch angiogenen Erkrankungen, Thrombosen, Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Tumoren, Osteoporose, Entzündungen, Infektionen sowie zur Beeinflussung von Wundheilungsprozessen. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel bzw. sie enthaltende pharmazeutische Zubereitungen können in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die enterale (z.B. orale), parenterale, topische Applikation oder für eine Applikation in Form eines Inhalation-Sprays eignen und mit den neuen Verbindungen nicht reagieren, beispielsweise Wasser, pflanzliche Öle, Benzylalkohole, Alkylenglykole, Polyethylenglykole, Glycerintriacetat, Gelatine, Kohlehydrate wie Lactose oder Stärke, Magnesiumstearat, Talk, Vaseline. Zur oralen Anwendung dienen insbesondere Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Pulver, Granulate, Sirupe, Säfte oder Tropfen, zur rektalen Anwendung Suppositorien, zur parenteralen Anwendung Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate, für die topische Anwendung Salben, Cremes oder Puder. Die neuen Verbindungen können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen, Farb-, Geschmacks- und /oder/ mehrere weitere Wirkstoffe enthalten, z. B. ein oder mehrere Vitamine. Für die Applikation als Inhalationsspray können Sprays verwendet werden, die den Wirkstoff entweder gelöst oder suspendiert in einem Treibgas oder Treibgasgemisch (z. B. CO<sub>2</sub> oder Fluorchlorkohlenwasserstoffen) enthalten. Zweckmäßig verwendet man den Wirkstoff dabei in mikronisierter Form, wobei ein oder mehrere zusätzliche physiologisch verträgliche Lösungsmittel zugegen

sein können, z. B. Ethanol. Inhalationslösungen können mit Hilfe üblicher Inhalatoren verabreicht werden.

Die erfindungsgemäßen Substanzen können in der Regel in Analogie zu anderen  
5 bekannten, im Handel befindlichen Peptiden (z.B. beschrieben in der US-A-4 472  
305 ) verabreicht werden, vorzugsweise in Dosierungen zwischen etwa 0,05 und  
500 mg, insbesondere zwischen 0,5 und 100 mg pro Dosierungseinheit  
verabreicht. Die tägliche Dosierung liegt vorzugsweise zwischen etwa 0,01 und  
20 mg/kg Körpergewicht. Die spezielle Dosis für jeden Patienten hängt jedoch  
10 von den verschiedensten Faktoren ab, beispielsweise von der Wirksamkeit der  
eingesetzten speziellen Verbindung, vom Alter, Körpergewicht, allgemeinen  
Gesundheitszustand, Geschlecht, von der Kost, vom Verabreichungszeitpunkt  
und -weg, von der Ausscheidungsgeschwindigkeit, Arzneistoffkombination und  
Schwere der jeweiligen Erkrankung, welcher die Therapie gilt. Die parenterale  
15 Applikation ist bevorzugt.

Die Erfindung umfaßt schließlich auch rekombinante DNA-Sequenzen, welche  
Abschnitte enthalten, die für Peptidbereiche codieren, die die erfindungsgemäßen  
peptidischen Struktur motive der Formeln I bis VI aufweisen.

20 Solche DNA kann durch Partikel auf Zellen übertragen werden, wie in Ch. Andree  
et al. Proc.Natl.Acad.Sci. 91, 12188-12192 (1994) beschrieben ist, oder der  
Transfer auf Zellen kann durch andere Hilfsmittel, wie Liposomen, gesteigert  
werden (A.I. Aronsohn and J.A. Hughes J. Drug Targeting, 5, 163-169 (1997)).

25 Der Transfer einer solchen DNA könnte demnach in Hefen, mittels Bacculo-Viren  
oder in Säugerzellen für die Produktion der peptidischen Substanzen dieser  
Erfindung benutzt werden.

30 Wird ein tierischer oder menschlicher Organismus mit solch einer rekombinante  
DNA infiziert, dann können die durch die infizierten Zellen letztlich selbst  
gebildeten erfindungsgemäßen Peptide unmittelbar an den  $\alpha_v\beta_6$  -  
Integrinrezeptor, beispielsweise von Tumorzellen binden und ihn blockieren.

Entsprechende rekombinante DNA, die durch bekannte und übliche Techniken bereitgestellt werden kann, kann beispielsweise aber auch in Form von Virus-DNA vorliegen, welche Abschnitte enthält, die für das Virus-Hüllprotein codieren. Durch Infektion eines Wirtsorganismus mit derartigen rekombinanten, vorzugsweise nicht pathogenen Viren, können Wirtszellen, die das Integrin  $\alpha_v\beta_6$  exprimieren, bevorzugt angegriffen werden (Targetierung).

- Geeignete Viren sind beispielsweise Adenovirenarten, die mehrfach schon als Vektoren für fremde Gene in Säugerzellen benutzt wurden. Eine Anzahl von Eigenschaften machen sie zu guten Kandidaten für Gentherapie, wie S.J. Watkins et al. Gene Therapy 4, 1004-1012 (1997) zu entnehmen ist (siehe auch J. Engelhardt et al. Hum. Gene Ther. 4, 759-769 (1993)) . Wie in A. Fasbender et al. J.Clin.Invest. 102, 184-193 (1998) zu finden ist, ist gemeinsames Problem bei Gentherapie durch virale und nichtvirale Vektoren die limitierte Effizienz des Gentransfers. Mit der oben beschriebenen zusätzlichen Ligandensequenz für  $\alpha_v\beta_6$  Integrin im Hüllprotein der Adenoviren kann eine Verbesserung des Transfers z.B. von Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) cDNA erreicht werden.
- Ähnlich wie in der Arbeit von T. Tanaka et al. Cancer Research 58, 3362-3369 (1998) kann statt der DNA für Angiostatin auch die DNA für die Sequenzen dieser Erfindung für Zelltransfektionen mittels retroviraler oder adenoviraler Vektoren genutzt werden.
- Die erfindungsgemäßen Peptide können auch innerhalb eines Liposomenkomplexes aus Lipid/Peptid/DNA für eine Transfektion von Zellkulturen hergestellt zusammen mit einem Liposomen-Komplex bestehend aus Lipid/DNA (ohne Peptid) für den Einsatz in der Gentherapie am Menschen eingesetzt werden. Die Herstellung eines Liposomenkomplexes aus Lipid/DNA/Peptid ist beispielsweise bei Hart S.L, et al 1998: Lipid-Mediated Enhancement of Transfection by a Non-Viral Integrin-Targeting Vector. Human Gene Therapy 9, 575-585, beschrieben.

Ein Liposomenkomplex aus Lipid/Peptid/DNA ist beispielsweise aus folgenden Stammlösungen herstellbar:

1 µg/µl Lipofectin (äquimolare Mischung aus DOTMA (= N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium Chlorid ) und DOPE (Dioleyl

5 Phosphatidylethanolamin), 10 µg/ml Plasmid DNA und 100 µg/ml Peptid. Sowohl DNA als auch Peptid werden dazu in Zellkulturmedium gelöst.

Der Liposomenkomplex wird durch Mischen der drei Komponenten in einem bestimmten Gewichtsverhältnis (Lipid: DNA: Peptid, z.B. 0,75 : 1 : 4) hergestellt. Liposomen DNA-Komplexe für eine Gentherapie am Menschen sind bereits

10 beschrieben worden (Caplen N.J., et al 1995: Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis Nature Medicine 1, 39-46).

Gegenstand der Erfindung ist somit auch die Verwendung entsprechend  
15 modifizierter rekombinater DNA von Gen-freisetzenden Systemen, insbesondere Virus-DNA, zur Bekämpfung von Krankheiten welche mittelbar oder unmittelbar auf einer Expression von  $\alpha_v\beta_6$  -Integrinrezeptoren beruhen, insbesondere also bei pathologisch angiogenen Erkrankungen, Thrombosen, Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Tumoren, Osteoporose, Entzündungen,  
20 Infektionen sowie zur Beeinflussung von Wundheilungsprozessen.

Die neuen erfindungsgemäßen Verbindungen können auch als Integrinliganden zur Herstellung von Säulen für die Affinitätschromatographie zur Reindarstellung von Integrinen verwendet werden. Der Komplex aus einem Avidin-derivatisierten  
25 Trägermaterial, z.B. Sepharose und den neuen Verbindungen der Formel I wird nach an sich bekannten Methoden (z.B. E.A. Bayer and M. Wilchek in Methods of Biochemical Analysis Vol 26 The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology gebildet. Als polymere Trägermaterialien eignen sich dabei die an sich in der Peptidchemie bekannten polymeren festen Phasen mit  
30 vorzugsweise hydrophilen Eigenschaften, beispielsweise quervernetzte Polyzucker wie Cellulose, Sepharose oder Sephadex<sup>R</sup>, Acrylamide, Polymer auf Polyethylenglykolbasis oder Tentakelpolymere<sup>R</sup>.

Beispiel 1



*Herstellung und Aufreinigung erfindungsgemäßer Peptide:*

Prinzipiell erfolgte die Herstellung und Aufreinigung mittels Fmoc-Strategie unter Protektion säurelabiler Seitenketten auf säurelabilen Harzen unter Benutzung eines kommerziell erhältlichen "continuous flow" Peptidsynthesizers

5 entsprechend den Angaben von Haubner et al. (J. Am. Chem. Soc. 118, 1996, 17703).

Exemplarisch wird im folgenden die Synthese und Aufreinigung für das Peptidamid Ac-RTDLD<sub>2</sub>SLR-NH<sub>2</sub> beschrieben. Für die Synthese von Peptidsäuren wurde ein o-Chlortritylchlorid-Harz (Novabiochem) nach Herstellerangaben mit  
10 der entsprechenden C-terminalen Fmoc-Aminosäure belegt und im Synthesegerät entsprechend den Herstellerangaben (Milligen) verwendet. Die prinzipiellen Schritte sind Waschen - Fmoc-Schutzgruppe abspalten - Waschen - Kupplung mit der nächsten Fmoc-Aminosäure - Capping (Acetylierung) - Waschen. Ist eine N-terminale Acylierung nach letzter Aminosäurekupplung  
15 erwünscht, so erfolgt diese nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe mit dem entsprechenden aktivierten Acylrest, z.B. dem Essigsäureanhydrid.

2 g 9-Fmoc-Aminoxanthyloxy-Harz (Novabiochem, 0.37 mmol/g) wurden nacheinander mit je 0.45 g Hydroxybenzotriazol Hydrat (HOBt), 0.5 ml Ethyl-diisopropylamin, je 4 Äquivalenten Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Fmoc-  
20 Aminosäure in Dimethylformamid (DMF), in einem kommerziellen Synthesegerät und einer typischen Prozedur (Gerät und Handbuch Milligen 9050 PepSynthesizer™, 1987), für jeweils 60 min, einem Kupplungsschritt unterworfen. Waschschriffe erfolgten in DMF für 10 min, Abspaltungsschritte in Piperidin/DMF (1:4 vol) für 5 min, N-terminale Acetylierungen (Capping) wurden  
25 mit Essigsäureanhydrid/Pyridin/DMF (2:3:15 vol) für 15 min durchgeführt. Es kamen die Aminosäuren Fmoc-Arg(Pmc), danach Fmoc-Leu, danach Fmoc-Ser(But), danach Fmoc-Asp(OBut), danach Fmoc-Leu, Danach Fmoc-Asp(OBut), danach Fmoc-Thr(But), und schließlich Fmoc-Arg(Pmc) zum Einsatz.

Nach Waschen mit DMF und Isopropanol und folgender Trocknung am Vakuum  
30 wurden 3.48 g des N-terminal acetylierten Peptidyl-Harzes, Ac-Arg(Pmc)-Thr(But)-Asp(OBut)-Leu-Asp(OBut)-Ser(But)-Leu-Arg(Pmc)-Aminoxanthyloxy-Harz erhalten.

Durch Behandlung dieses Peptidylharzes mit Trifluoressigsäure / Anisol / Dichlormethan (74 ml / 3.7 ml / 74 ml) für 4 h bei Raumtemperatur, Filtration, Einengen am Vakuum und Verreiben mit Diethylether konnte ein Niederschlag von 0.6 g Peptid, Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>, erhalten werden.

- 5 Eine Reinigung des Produktes erfolgte per RP-HPLC auf Lichrosorb RP18 (250-25, 7 µm, Merck KGaA) in 0.3% TFA mit einem Gradienten von 4% auf 24% 2-Propanol in 2 h bei 8 ml/min und Beurteilung mittels UV-Durchflussphotometer bei 215 nm.

Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden gefriergetrocknet. Das erhaltene

- 10 Produkt entsprach nach FAB-MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy) den Erwartungen: C<sub>41</sub> H<sub>73</sub> N<sub>15</sub> O<sub>15</sub> M 1015,5 g/mol; (M+H)<sup>+</sup> ist 1016.

Das gereinigte Produkt Ac-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> hat in der analytischen HPLC auf SuperSpher RP18e (250-4, Merck KGaA) bei einem Gradienten von 0-99 % A (0.08 m Phosphat pH 3.5, 15 % Acetonitril) nach B

- 15 (0.03 m Phosphat pH 3.5, 70% Acetonitril) in 50 min, bei 1ml/min, und Detektion bei 215 nm, eine Retentionszeit von 7.22 min.

Weitere HPLC-Analysen erfolgten in den beiden folgenden Systemen:

- 20 **System A:** 0,3% Trifluoressigsäure mit einem Gradienten von 0 – 80% 2-Propanol in 50 min auf LichroSpher 60 RP-Select B<sup>®</sup> (250-4) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), bei 1 ml/ min, und Detektion bei 215 nm.

**System B:** 0,1% Trifluoressigsäure mit einem Gradienten von 30 – 70% Acetonitril in 50 min auf SuperSpher 100 RP18e<sup>®</sup> (250-4) (Merck KGaA,

- 25 Darmstadt, Germany), bei 1 ml/ min und Detektion bei 215 nm.

## Beispiel 2

Analog Beispiel 1 wurden folgende in Tabelle 1 wiedergegebene Peptide hergestellt und gereinigt.

Tab.1:

Struktur	MW (g/mol)	FAB-MS [M+H] gefunden	Rt (HPLC) / min (Syst m A)	Rt (HPLC) / min (System A)
RTDLDSLRTYTL	1453,6	1456	21,9	
DSLRTYTL	968,1	969	18,6	
RTDLDSL	818,9	820	18,6	23,6
DLDSLRTY	982,1	983	16,6	
RTDLDSLRL	975,1	975	13,5	
RTDLDSLRTY	1239,3	1239	16,6	
Ac-RTDLDSLRT	1118,2	1119	16,2	15,6
RTDLDSLRT	1076,2	1076	13,9	
RTDLPSLRTY	1221,4	1221	19,2	
RTDLDLRT-NH <sub>2</sub>	988,1	989	13,4	
Ac- RTDLDLRT-NH <sub>2</sub>	1030,2	1031	15,3	
RTDLYYLM DL	1302,5	1302		28,2
RTDLDSLRT-NH <sub>2</sub>	1075,2	1076	11,1	13,8
RTDLDP LRTY	1249,4	1250	16,3	
RTDLYYLRTY	1363,5	1363		11,5
Ac-RTDLDSLRT-NH <sub>2</sub>	1117,2	1118	13,2	15,0
Ac-RTDLDSLRL-NH <sub>2</sub>	1015,5	1016	siehe Beispiel 1	
TDLDSLRT	920,0	920		14,8
PVDLYYLM DL	1241,5	1241	36,1	

Als Vergleichsverbindungen dienten bekannte RGD-Peptide wie GRGDSPK, zylo-(RGDfV), sowie das lineare Peptid DLYYLM DL.

5

### Beispiel 3

#### *Herstellung einer $\alpha_v\beta_6$ - Integrin Präparation:*

$\alpha_v\beta_6$  wurde in löslicher transmembraner verkürzter Form ( Weinacker et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 6940) aus einem Baculovirus Expressionssystem gemäß für  
 10  $\alpha_v\beta_3$  bekannter Rekombinationstechniken (Mehta et al., 1998, Biochem. J. 330, 861) unter Verwendung von 14D9.F8 Antikörper-Affinitätschromatographie (Mitjans et al., 1995, J Cell Sci. 108, 2825) gewonnen und gereinigt. Humane  $\alpha_v$  und  $\beta_6$  cDNA Klone sind generell bekannt und allgemein zugänglich. Der Transfervektor pAcUW31 (Clontech Lab. Inc., USA), der eine gleichzeitige  
 15 Expression von zwei unterschiedlichen Ziel- cDNAs erlaubt, wurde eingesetzt,

um transmembranes verkürztes  $\alpha_v\beta_6$  aus rekombinanten Baculovirus-Zellen zu exprimieren. Dazu wurde ein  $\alpha_v$  Transfervektor hergestellt und transmembranes verkürztes ( $\Delta$ TM)  $\alpha_v$  aus dem Plasmid  $\alpha_v\Delta$ TM(pBAC9) unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI herausgeschnitten (Mehta et al., Lit. s. o.) und mittels "blunt-end" Ligation in die BamHI Schnittstelle von pAcUW31 "downstream" des Polyhedrin Promotors einkloniert. Transmembrane verkürzte  $\beta_6$  cDNA wurde aus dem Plasmid pCDNAneo $\beta_6$  (Weinacker et al., Lit. s. o.) unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI herausgeschnitten und ebenfalls mittels "blunt-end" Ligation in die BamHI Schnittstelle von pAcUW31 "downstream" des Polyhedrin Promotors einkloniert. Die verkürzten  $\alpha_v$  und  $\beta_6$  enthaltenden Tandem-Vektoren wurden verwendet, um rekombinantes Baculovirus (Mehta et al., Lit. s. o.) zu erhalten. Die rekombinanten Baculoviren wurden eingesetzt, um "High Five"- Insektenzellen zu infizieren. Der lösliche Rezeptor wurde nach 48-71 stündiger Kultivierung gewonnen, in dem man den Überstand der Zellkultur über Affinitätssäulen der oben angegebenen Art führte und bei pH 3,1 eluierte. Alle Verfahrensschritte wurden bei Raumtemperatur und in Abwesenheit jeglicher Detergentien ausgeführt. Die Peakfraktionen wurden neutralisiert, konzentriert und bei 4°C dialysiert und schließlich bei -80°C aufbewahrt. Der so erhaltene rekombinante lösliche humane Rezeptor ist biologisch aktiv und behält seine Liganden-Spezifität. Eine ähnliche für lösliches  $\alpha_v\beta_3$  angewandte Herstellungsmethode wurde in der EP 0846 702 beschrieben.

#### Beispiel 4:

##### $\alpha_v\beta_6$ / Fibronektin Rezeptorbindungstest:

Die hergestellten erfindungsgemäßen Peptide wurden in Lösung zusammen mit kompetitiv wirkenden Fibronektin an den immobilisierten  $\alpha_v\beta_6$  Rezeptor gebunden und der Q-Wert als Maß für die Selektivität der Bindung des zu testenden Peptids an  $\alpha_v\beta_6$  ermittelt. Der Q-Wert berechnet sich dabei aus dem Quotienten der IC<sub>50</sub>-Werte von Testpeptid und einem Standard. Als Standard diente das lineare Hepta-RGD-Peptid GRGDSPK (Lit./Patent vgl Pytela et al. Science 231, 1559, (1986)).

Der Bindungstest wurde im einzelnen wie folgt durchgeführt:

Die Immobilisierung von löslichem  $\alpha_v\beta_6$  Rezeptor auf Microtiterplatten erfolgte durch Verdünnung der Proteinlösung in TBS++ und anschließender Inkubation über Nacht bei 4°C (100  $\mu$ l/Vertiefung). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation (2 h, 37°C) mit 3% (w/v) BSA in TBS++ (200  $\mu$ l/Vertiefung) blockiert. Überschüssiges BSA wurde durch dreimaliges Waschen mit TBSA++ entfernt. Peptide wurden seriell (1:10) in TBSA++ verdünnt und zusammen mit biotinyliertem Fibronectin (2  $\mu$ g/ml) mit dem immobilisierten Integrin inkubiert (50  $\mu$ l Peptid + 50  $\mu$ l Ligand pro Vertiefung; 2 h; 37°C). Nicht gebundenes Fibronectin und Peptide wurden durch dreimaliges Waschen mit TBSA++ entfernt. Die Detektion des gebundenen Fibronectin erfolgte durch Inkubation (1 h; 37°C) mit einem alkalische-Phosphatase-gekoppelten anti-Biotin-Antikörper (Biorad) (1:20000 in TBSA++; 100  $\mu$ l/Vertiefung). Nach dreimaligem Waschen mit TBSA++ erfolgte die kolorimetrische Detektion durch Inkubation (10-15 min; 25°C, im Dunkeln) mit Substratlösung (5 mg Nitrophenylphosphat, 1 ml Ethanolamin, 4 ml H<sub>2</sub>O; 100  $\mu$ l/Vertiefung). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 0,4 M NaOH (100  $\mu$ l/Vertiefung) gestoppt. Die Farbintensität wurde bei 405 nm im ELISA-Meßgerät bestimmt und gegen den Nullwert abgeglichen. Als Nullwert dienten Vertiefungen, die nicht mit Rezeptor beschichtet waren. Als Standard wurde GRGDSPK eingesetzt. Die IC<sub>50</sub>-Werte für die getesteten Peptide wurden aus einer Graphik abgelesen und daraus zusammen mit dem IC<sub>50</sub>-Wert des Standardpeptids der Q-Wert des erfindungsgemäßen Peptids ermittelt. Die Ergebnisse des beschriebenen Tests sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tab. 2

Struktur	Q-Wert =
	IC <sub>50</sub> Testpeptid / IC <sub>50</sub> Standardpeptid
GRGDSPK	1,0 (IC <sub>50</sub> = 400 nM)
zyklo-(RGDFV)	0,6
DLYYLMDL	Inaktiv (IC <sub>50</sub> > 50 µM)
RTDLDLRTYTL	0,27
DSLRTYTL	inaktiv (IC <sub>50</sub> > 50 µM)
RRDLDSL	2,5
DLDSLRTY	inaktiv (IC <sub>50</sub> > 50 µM)
RTDLDLRL	0,17
RTDLDLRLTY	0,10
Ac-RTDLDLRLT	0,029
RTDLDLRLT	0,11
RTDLDLRLT-NH <sub>2</sub>	1,1
Ac-RTDLDLRLT-NH <sub>2</sub>	0,5
RTDLYYLMDL	0,33
RTDLDLRLT-NH <sub>2</sub>	0,056
RTDLDPLRTY	0,50
RTDLYYLRTY	0,042
Ac-RTDLDLRLT-NH <sub>2</sub>	0,013
TDLDLRLT	66
PVDLYYLMDL	inaktiv (IC <sub>50</sub> > 50 µM)

Q-Werte kleiner 1 bedeuten, daß sie eine relativ bessere Bindung zum Rezeptor aufweisen, als vergleichsweise das Standardpeptid, welches absolut gesehen, bereits eine gute Bindung im Wettbewerb mit dem natürlichen Liganden Fibronectin besitzt.

### Beispiel 5

Analog des vorangehenden Beispiels wurden zu Vergleichszwecken Integrin-Liganden Bindungstests mit unterschiedlichen Integrinen (z.B.  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ) und ihren entsprechenden Liganden (z.B. Vitronectin, Fibrinogen) durchgeführt.

**Beispiel 6:**

Allgemeine Herstellung eines DNA-Liposom-Komplexes und Anwendung für die Gentherapie:

Man mischt Lipid und DNA im Gewichtsverhältnis 5:1 (Lipid:DNA) in Krebs-

- 5 HEPES-Lösung ( 140mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM KCl, 10mM HEPES, 10 mM D-Glucose; pH 9,0). Dabei beträgt die Einzeldosis 30 µg DNA/200 µl. 200 µl dieses Lipid-DNA-Komplexes werden mit einen Pumpzerstäuber auf des Nasenepithel aufgebracht. Das wird 10 mal im Abstand von 15 min wiederholt. Die Gesamtdosis DNA beträgt 300 µg.

10

Die nachfolgenden Beispiele betreffen pharmazeutische Zubereitungen:

**Beispiel A: Injektionsgläser**

Eine Lösung von 100 g eines Wirkstoffes der Formel I und 5 g Dinatriumhydro-  
15 genphosphat werden in 3 l zweifach destilliertem Wasser mit 2 n Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt, steril filtriert, in Injektionsgläser abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jedes Injektionsglas enthält 5 mg Wirkstoff.

**20 Beispiel B: Suppositorien**

Man schmilzt ein Gemisch von 20 g eines Wirkstoffes der Formel I mit 100 g Sojalecithin und 1400 g Kakaobutter, gießt in Formen und läßt erkalten. Jedes Suppositorium enthält 20 mg Wirkstoff.

**25 Beispiel C: Lösung**

Man bereitet eine Lösung aus 1 g eines Wirkstoffes der Formel I, 9,38 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 28,48 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O und 0,1 g Benzalkoniumchlorid in 940 ml zweifach destilliertem Wasser. Man stellt auf pH 6,8 ein, füllt auf 1 l auf und sterilisiert durch Bestrahlung. Diese Lösung kann in Form von Augentropfen  
30 verwendet werden.

**Beispiel D: Salbe**

Man mischt 500 mg eines Wirkstoffes der Formel I mit 99,5 g Vaseline unter aseptischen Bedingungen.

5

**Beispiel E: Tabletten**

Ein Gemisch von 1 kg Wirkstoff der Formel I, 4 kg Lactose, 1,2 kg Kartoffelstärke, 0,2 kg Talk und 0,1 kg Magnesiumstearat wird in üblicher Weise zu Tabletten verpreßt, derart, daß jede Tablette 10 mg Wirkstoff enthält.

10

**Beispiel F: Dragees**

Analog Beispiel E werden Tabletten gepreßt, die anschließend in üblicher Weise mit einem Überzug aus Saccharose, Kartoffelstärke, Talk, Tragant und Farbstoff überzogen werden.

15

**Beispiel G: Kapseln**

2 kg Wirkstoff der Formel I werden in üblicher Weise in Hartgelatine kapseln gefüllt, so daß jede Kapsel 20 mg des Wirkstoffs enthält.

**Beispiel H: Ampullen**

Eine Lösung von 1 kg Wirkstoff der Formel I in 60 l zweifach destilliertem Wasser wird steril filtriert, in Ampullen abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jede Ampulle enthält 10 mg Wirkstoff.

**Beispiel I: Inhalations-Spray**

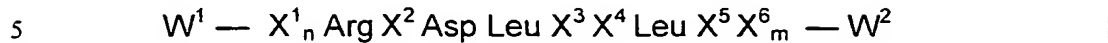
Man löst 14 g Wirkstoff der Formel I in 10 l isotonischer NaCl-Lösung und füllt die Lösung in handelsübliche Sprühgefäße mit Pump-Mechanismus. Die Lösung kann in Mund oder Nase gesprüht werden. Ein Sprühstoß (etwa 0,1 ml) entspricht einer Dosis von etwa 0,14 mg.

25



# Patentansprüche

## 1. Peptidische Verbindungen der Formel I



worin bedeuten:

$X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6$  jeweils unabhängig voneinander einen Aminosäurerest, wobei die Aminosäuren unabhängig voneinander ausgewählt sind aus einer Gruppe bestehend aus Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, Gln, Glu, Gly, Phe, His, Ile, Leu, Lys, Met, Nle, homo-Phe, Phg, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr oder Val, und die genannten Aminosäuren auch derivatisiert sein können,

$W^1$  H oder Ac,

$W^2$  OH, OR, NHR,  $NR_2$ ,  $NH_2$ ,

R Alkyl mit 1-6 C-Atomen und

n, m jeweils unabhängig voneinander eine Zahl von 0 – 15.

2. Peptidische Verbindungen nach Anspruch 1, worin  $X^2$  einen Aminosäurerest darstellt, der ausgewählt aus der Gruppe Thr, Ser, Asp oder Glycin, ist.

3. Peptidische Verbindungen nach Anspruch 1, worin  $X^3$  ein Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe Asp, Glu, Arg, Lys, His oder Tyr ist.

4. Peptidische Verbindungen nach Anspruch 1, worin  $X^4$  ein Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe Ser, Tyr, Thr, Gly oder Val ist.

5. Peptidische Verbindungen nach Anspruch 1 gemäß der Formel V



mit den in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen.

6. Peptidische Verbindung nach Anspruch 5 gemäß der Formel VI



- 5 7. Peptidische Verbindungen der Formel I oder II gemäß der Ansprüche 1 bis 6 sowie ihrer physiologisch unbedenklichen Salze als Arzneimittel.
8. Arzneimittel nach Anspruch 7 als Inhibitor zur Bekämpfung von Erkrankungen, die auf einer Expression und pathologischen Funktion von  $\alpha_v\beta_6$  Integrinrezeptoren beruhen.
- 10 9. Arzneimittel nach Anspruch 8 zur Bekämpfung von Thrombosen, Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Tumoren, Osteoporose, Fibrosen, Entzündungen, Infektionen, Psoriasis sowie zur Beeinflussung von Wundheilungsprozessen.
- 15 10. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Arzneimittel gemäß einem der Ansprüche 7 bis 9 sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und gegebenenfalls andere Wirkstoffe.
- 20 11. Verwendung von peptidischen Verbindungen gemäß der Ansprüche 1 bis 6 und/oder ihre physiologisch unbedenklichen Salze zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Erkrankungen, die auf einer Expression und pathologischen Funktion von  $\alpha_v\beta_6$  Integrinrezeptoren beruhen.
- 25 12. Verwendung nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Thrombosen, Herzinfarkt, koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Tumoren, Osteoporose, Fibrosen, Entzündungen, Infektionen, Psoriasis sowie zur Beeinflussung von Wundheilungsprozessen.
- 30

13. Rekombinante DNA, enthaltend eine Sequenz, welche für einen Peptidabschnitt codiert, der einer peptidischen Verbindung der Ansprüche 1 - 6 entspricht.

5 14. Rekombinante Virus-DNA nach Anspruch 13.

15. Virus, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Hüllprotein besitzt, welches eine Sequenz aufweist, die einer peptidischen Verbindung der Ansprüche 1 - 6 entspricht.

10

16. Verwendung eines Virus nach Anspruch 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Erkrankungen, die auf einer Expression und pathologischen Funktion von  $\alpha_v\beta_6$  Integrinrezeptoren beruhen.

15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/09842

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K7/06 C07K7/08 C12N15/10 A61K38/04 A61P7/02				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N A61K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
P,X	KRAFT E.A.: "Definition of an unexpected ligand recognition motif for alpha3B6 integrin" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 4, 22 January 1999 (1999-01-22), pages 1979-1985, XP002136307 MD US the whole document	1-16		
X	JACKSON E.A.: "RGD-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin alpav83 in vitro" JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 71, no. 11, November 1997 (1997-11), pages 8357-8361, XP002136308 ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US see especially Table 1	1,2,4, 7-10, 13-15		
-/--				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents :				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>			
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25 April 2000</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">11/05/2000</div>		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Groenendijk, M</div>		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/EP 99/09842

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LEHNER E.A.: "Immunogenicity of synthetic peptides derived from the sequences of a streptococcus mutans cell surface antigen in nonhuman primates"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 143, no. 8, 15 October 1989 (1989-10-15), pages 2699-2705, XP002136309 BALTIMORE US</p> <p>See especially Table 1, no. 23</p> <p>---</p>	1-4, 7-10
X	<p>US 5 700 680 A (NEWTON SUSAN ELIZABETH ET AL) 23 December 1997 (1997-12-23)</p> <p>See especially Fig.4; columns 3-4 and claims 1-8</p> <p>-----</p>	1-4, 13, 14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP99/09842

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
2. 1-4, 7-16 (all partially)  
  
See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## ADDITIONAL MATTER

PCT/ISA/210

Continuation of Box I.2

Claims Nr.: 1-4, 7-16 (all in part)

The initial phase of the search resulted in a very large number of documents prejudicial as to novelty (>170). This figure is so large that it is impossible to determine for what is legal protection eventually being sought in the totality of patent claims (PCT Article 6). Hence, a meaningful search covering the entire range of patent claims appeared to be impossible. For this reason, the search was limited to compounds of formula I, wherein X2, X3 and X4 represent amino acid radicals selected from the groups of patent claims 2-4.

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/09842

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5700680 A	23-12-1997	AU 609713 B	09-05-1991
		AU 6979387 A	11-08-1988
		CA 1319629 A	29-06-1993
		JP 2836815 B	14-12-1998
		JP 63196293 A	15-08-1988
		NZ 219515 A	27-09-1989



## INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

In. ation Patentzeichen

PCT/EP 99/09842

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K7/06 C07K7/08 C12N15/10 A61K38/04 A61P7/02

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12N A61K

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>2</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	KRAFT E.A.: "Definition of an unexpected ligand recognition motif for alpha386 integrin" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 274, Nr. 4, 22. Januar 1999 (1999-01-22), Seiten 1979-1985, XP002136307 MD US das ganze Dokument	1-16
X	JACKSON E.A.: "RGD-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin alpav83 in vitro" JOURNAL OF VIROLOGY., Bd. 71, Nr. 11, November 1997 (1997-11), Seiten 8357-8361, XP002136308 ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US Siehe besonders tabelle 1	1,2,4, 7-10, 13-15
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie<sup>2</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Groenendijk, M

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LEHNER E.A.: "Immunogenicity of synthetic peptides derived from the sequences of a streptococcus mutans cell surface antigen in nonhuman primates" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 143, Nr. 8, 15. Oktober 1989 (1989-10-15), Seiten 2699-2705, XP002136309 BALTIMORE US Siehe besonders tabelle 1, Nr.23 ---	1-4,7-10
X	US 5 700 680 A (NEWTON SUSAN ELIZABETH ET AL) 23. Dezember 1997 (1997-12-23) Siehe besonders abb. 4 ; spalten 3-4 und patentansprüche 1-8 -----	1-4,13, 14

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09842

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
1-4, 7-16 (alle partiell)  
  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99 09842

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-4,7-16(Alle partiell)

Die Recherche ergab in ihrer Anfangsphase eine sehr große Zahl neuheitsschädlicher Dokumente (>170). Diese Zahl ist so groß, daß sich unmöglich feststellen lässt, für was in der Gesamtheit der Patentansprüche eventuell nach zu Recht Schutz begehrt werden könnte (Art. 6 PCT). Aus diesen Gründen erscheint eine sinnvolle Recherche über den gesamten Bereich der Patentansprüche unmöglich. Die Recherche wurde daher beschränkt auf Verbindungen der Formel I worin X2, X3 und X4 Aminosäurereste darstellen die ausgewählt sind aus den Gruppen der Ansprüche 2-4.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Im internationalen Patentzeichen

PCT/EP 99/09842

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5700680 A	23-12-1997	AU 609713 B	09-05-1991
		AU 6979387 A	11-08-1988
		CA 1319629 A	29-06-1993
		JP 2836815 B	14-12-1998
		JP 63196293 A	15-08-1988
		NZ 219515 A	27-09-1989
<hr/>			

